

**Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

ДУДАР ЛЮДМИЛА ВАЛЕРІЇВНА



УДК: 575.86 + 578.832.1

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА
ІЗОЛЯТІВ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ,
ІДЕНТИФІКОВАНИХ В УКРАЇНІ**

03.00.06 – вірусологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Поліщук Валерій Петрович,
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка,
професор кафедри вірусології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Матвієнко Наталія Миколаївна,
Інститут рибного господарства НААН,
завідувач відділу іхтіопатології

кандидат біологічних наук
Загородня Світлана Дмитрівна,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України,
завідувач відділу репродукції вірусів

Захист відбудеться 23 квітня 2019 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, проспект академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, спеціалізована вчена рада Д 26.001.14.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий «21» березня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



В.В. Джаган

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У зв'язку з інтенсивним та неконтрольованим розвитком промислового вирощування свиней впродовж 2000-х років, Україна перетворилась на територію, де постійно з'являються реемерджентні та емерджентні захворювання цих тварин. Зважаючи на інтенсивний розвиток галузі, в Україну активно ввозилися племінні тварини з різних країн, що могли бути інфіковані різноманітними патогенами. Зокрема, цирковірус свиней 2 типу (ЦВС2) є широко розповсюдженим вірусом і тому потрапляння його ізолятів різних генотипних груп було можливим в цей час. Далі шляхом горизонтальної передачі ЦВС2 поширився серед сприйнятливих тварин. Інші шляхи передачі включали використання складових тваринного походження для відгодівлі, а також переміщення транспортних засобів між господарствами та продаж інфікованих тварин. Таким чином, ЦВС2 набув надзвичайного поширення на території України, як власне і у всьому світі.

Цирковірус свиней 2 типу характеризується певною генетичною мінливістю і виявляється у популяціях свійських та диких свиней, є дуже стійким у доквіллі і стабільним навіть за високих температур і різних значень рН. Цьому вірусу також притаманна стійкість щодо багатьох поширених дезінфікуючих засобів, а тому його циркуляція є довготривалою. Клінічні ознаки цирковірусної інфекції свиней в Україні були описані ще з початку 2000-х років; однак інформація стосовно виявлення ізолятів ЦВС2, їхніх характеристик та поширення у різних регіонах, опублікована не була.

Таким чином, вивчення ЦВС2 та синдромів, асоційованих зі згаданим збудником, є надзвичайно важливим, оскільки щорічно українські господарства зазнають значних економічних збитків. Високий рівень контагіозності збудника та смертності тварин за згаданого захворювання зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-методів діагностики з метою як найшвидшої ідентифікації збудника у зразках та запровадження карантинних і профілактичних заходів.

Одним із підходів до вирішення цієї проблеми є створення діагностичних тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції, що є найшвидшим методом виявлення ЦВС2 як за хронічного перебігу захворювання, так і для диференціювання згаданого вірусу від інших патогенів свиней. Окрім того, успішний та ефективний контроль потребує даних щодо характеру поширення цирковірусу 2 типу в Україні, а особливо щодо характеру поширення ізолятів різних генотипних груп. Останнє, своєю чергою, уможливлуватиме прослідкування змін епізоотологічної ситуації з часом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної теми №11БФ 036-02 «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо-, та виробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка, № державної реєстрації 0111U004649.

Мета і завдання досліджень. Ідентифікувати ЦВС2 на території України, вивчити його молекулярно-біологічні особливості, дослідити поширеність та розробити підходи до диференційної діагностики даного патогену.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі **завдання:**

1) ідентифікувати ізоляти ЦВС2 у зразках патологічного матеріалу, отриманого від тварин з промислових господарств різних регіонів України та з'ясувати характер поширення вірусу (у тому числі ретроспективно);

2) розробити тест-систему для виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 на основі полімеразної ланцюгової реакції;

3) визначити специфічність та ефективність розробленої тест-системи;

4) ідентифікувати ДНК цирковірусу свиней 2 типу у патологічному матеріалі, отриманому від тварин промислових господарств та диких кабанів;

5) сиквенувати нуклеотидні послідовності геномів ізолятів ЦВС2, ідентифікованих від свиней з промислових господарств різних регіонів України та диких кабанів, здійснити молекулярно-філогенетичний аналіз та з'ясувати їхні еволюційні зв'язки;

6) розробити комплексний діагностичний підхід для виявлення ЦВС2-асоційованих захворювань на основі ПЛР в реальному часі, гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

Об'єкт дослідження – цирковірус свиней 2 типу та його діагностика.

Предмет дослідження – молекулярно-біологічна характеристика ізолятів ЦВС2, що циркулюють в Україні, захворюваність на цирковірус-асоційовані синдроми.

Методи дослідження – вірусологічні, серологічні, молекулярно-біологічні, гістологічні (патолого-формологічний аналіз та імуногістохімічне дослідження), філогенетичні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У цій роботі вперше було ідентифіковано цирковірус свиней 2 типу в зразках від тварин, що утримувалися у промислових господарствах, в 20 з 24 областей України та АР Крим. Описано молекулярно-біологічні особливості ізолятів, виділених від свійських свиней та диких кабанів, здійснено їхній філогенетичний аналіз та встановлено еволюційні взаємозв'язки. Отримані результати створюють можливість відслідковування поширення ЦВС2 на території України в майбутньому, встановлення шляхів його потрапляння, вдосконалення вже існуючої системи епідеміологічного та вірусологічного нагляду за ЦВС2, впровадження більш ефективних профілактичних та карантинних заходів. Окрім того, в перспективі є можливість виробництва діагностичних наборів на основі розроблених тест-систем ПЛР та ПЛР у реальному часі.

Також показано різницю у патогенезі на рівні тканин українських ізолятів ЦВС2. Запропонований комплексний підхід забезпечує можливість диференційного діагностування всіх існуючих ЦВС2-асоційованих синдромів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати молекулярно-біологічних особливостей ізолятів ЦВС2, що циркулюють в Україні, забезпечують необхідною інформацією для вдосконалення існуючих методів діагностики та впровадження комплексних підходів до профілактики захворювання. Це дозволить управлінським ветеринарним державним та приватним структурам більш ефективно реагувати на розповсюдження ЦВС2 в Україні та контролювати його шляхом вчасно проведених профілактичних заходів.

Розроблена тест-система на основі ПЛР може бути використана для ідентифікації ЦВС2 у матеріалі різних тканин та органів свиней, а також є інструментом отримання практично повногеномної нуклеотидної послідовності вірусу для подальшого сиквенування та філогенетичного аналізу. Це дозволить відслідковувати поширення існуючих генотипних груп вірусу на території України та встановлювати появу нових. Крім того, під час апробації створеної тест-системи було з'ясовано який саме матеріал найефективніше відбирати для аналізу та у яких вікових груп, що є цінною інформацією для діагностичних лабораторій. Більш того, для рутинної лабораторної діагностики розроблено тест-систему на основі ПЛР в реальному часі, що значно пришвидшує отримання результатів і є більш ефективною для проведення масових скринінгових досліджень. Вказаний аспект є ключовим для можливості швидкого прийняття рішень, впровадження дієвих засобів профілактики та заходів біобезпеки для контролю ЦВС2, що, своєю чергою, буде зумовлювати зменшення економічних втрат галузі.

Виявлено та описано характерні зміни в тканинах органів тварин, уражених ЦВС2, що створює можливість застосування гістологічного методу для диференційної діагностики ЦВС2, а запропонований метод імуногістохімічного аналізу доповнює розроблений нами комплексний підхід для підтвердження діагнозу всіх існуючих цирковірус-асоційованих захворювань. Такий підхід вже впроваджено в протокол роботи ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» (м. Київ), в якому здійснюється діагностика вірусних та бактеріальних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці з усієї України.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Розробка плану експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їхнє узагальнення, інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом д.б.н., проф. Поліщука В.П.

Розробку та апробацію тест-системи на основі ПЛР для виявлення ЦВС2 здійснено разом з завідуючим відділом молекулярної біології ДНКІБШМ, к.б.н. Дерябіним О.М.

Динаміку поширення ЦВС2 територією України у період 2007-2012рр. відслідковували з директором ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» Собко І.О.

Сиквенування повногеномних послідовностей ЦВС2 здійснювали разом з Gyula Balka та Attila Csagola в Інституті Ветеринарної Медицини ім. Святого Іштвана, Будапешт, Угорщина.

Філогенетичний аналіз вірусів, що циркулюють в Україні, проведений автором особисто на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за сприяння д.б.н., проф. Будзанівської І.Г.

Розробку тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі виконували разом із технічним спеціалістом ТОВ «АЛТ» Пігідою Д.С.

Гістологічні та імуногістохімічні дослідження були проведені у Центрі ветеринарної діагностики за участі завідувача відділу гістології, к.б.н. Іващенко О.А.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на засіданнях кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (щопівроку); VII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, Україна, 2013); V-ому Європейському симпозиуму здоров'я свиней (Единбург, Великобританія, 2013); 23-му Міжнародному конгресі Ветеринарної асоціації зі здоров'я свиней (Канкун, Мексика, 2014); VIII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, Україна, 2016); 24-му Міжнародному конгресі Ветеринарної асоціації зі здоров'я свиней (Дублін, Ірландія, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, серед яких 6 статей у фахових наукових виданнях (3 мають індекс цитування) та 5 тез доповідей (3 з яких міжнародні).

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, 3-х розділів власних досліджень, узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаної літератури, що охоплює 214 джерел. Дисертаційна робота викладена на 153 сторінках друкованого тексту. Фактичний матеріал подано у вигляді 8 таблиць та 39 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури складається з 5-ти підрозділів, де наведено найбільш актуальні відомості про ЦВС2, особливості його структурної та геномної організації, філогенетичні зв'язки та поширення в світі. Крім того, охарактеризовано клінічні прояви всіх цирковірус-асоційованих захворювань окремо та описано існуючі лабораторні методи діагностики ЦВС2. Огляд літератури обґрунтовує доцільність виконання роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були ізоляти ЦВС2, виділені зі зразків тканин та органів свиней, отримані з господарств 24 областей України та АР Крим.

Робота виконувалась у лабораторії вірусології, гістології, патанатомії ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» та кафедрі вірусології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для виділення вірусу використовували матеріал від тварин віком від 35 до 120 днів, у яких було відмічено зовнішні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів. Як об'єкт порівняння застосовували референс-штам ЦВС2, люб'язно наданий лабораторією молекулярних досліджень фармацевтичної компанії «Laboratorios Hirpa» (Іспанія) код доступу якого в базі даних GenBank – AF201310.

Аналіз морфолого-патологічного стану відібраних для дослідження тварин здійснювали у лабораторії патолого-анатомії ТОВ «Центр Ветеринарної діагностики» з метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання.

Для виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 методом ПЛР проводили аналіз і оптимізацію існуючих олігонуклеотидних праймерів до консервативної ділянки Сар-гену, довжиною 502 п.н., рекомендованих у 2005 році Міжнародним епізоотичним бюро (Office International des Epizooties – World Health Organization in Animal Health, OIE). А також здійснювали конструювання та оптимізацію нових унікальних олігонуклеотидних праймерів до послідовностей генів Сар- та Рер-протеїнів ЦВС2.

Крім того, проводили конструювання, розрахунок та біоінформатичний аналіз власних унікальних олігонуклеотидів та зондів для проведення ПЛР у реальному часі, а також порівняння такого підходу з існуючим та поширеним в світі, розробленим Blanchard та співав. в 2004 році.

Описаний аналіз виконували із використанням пакету програм Vector NTI Advanced 11 (Invitrogen, США) та програми для конфігурування олігонуклеотидів Primer3 v 4.0.0. вільно доступної за посиланням <http://bioinfo.ut.ee/primer3>.

Для виділення РНК та ДНК із відібраних зразків використовували тест-систему «Рибо-золь-А», (Інтерлабсервіс, РФ).

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації здійснювали у 1,7 % агарозному гелі. Результати, отримані після ПЛР в реальному часі, інтерпретували за допомогою програми Analysys (графіків) термоциклера.

Для сиквенування повного геному ЦВС2 продукт ампліфікації очищували з агарозного гелю за допомогою набору реагентів «mi-GelExtractionKit»(Metabion, Німеччина).

Для відпрацювання умов проведення ПЛР використовували зразки різних тканин (легені, лімфатичні вузли, кишечник) та біологічних рідин (кров, сперма) відібраних від свиней.

Для гістологічного дослідження відбирали секційний матеріал від уражених тварин (шматочки нирок, печінки, селезінки, легень, серця, мозку, трахеї, лімфатичних вузлів, кишковика). Під час відбору матеріалу для дослідження враховували будову органів та тканин: нирки розрізали

перпендикулярно до поверхні так, щоб у зразку була наявна кіркова та мозкова речовина; паренхіматозні органи (селезінку, печінку) відбирали з капсулою; стінки порожнистих органів – поперечними зрізами.

Фіксування досліджуваних зразків тканин органів здійснювали за модифікованою методикою Зубкової та колег (Зубкова та ін., 1998). Гістологічні препарати виготовляли за стандартною методикою (Горальський та ін., 2005). Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Зміни виявляли аналізуючи препарати під світловим мікроскопом за збільшення в 40, 400 та 4000 разів.

Імуногістохімічну реакцію проводили за раніше опублікованими методиками (Kim et al., 2004) із використанням моноклональних антитіл PCV VP2HQ ORF2 (Ingenasa, Іспанія). Візуалізацію антигенів проводили за допомогою пероксидази та вторинних поліклональних антитіл (Sigma, США). Мікроскопіювання проводили за збільшення у 200 та 400 разів.

Секвенування очищених ампліфікованих послідовностей ЦВС2 проводили на Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer із застосуванням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, США). Пошук та вибірку необхідних послідовностей здійснювали використовуючи BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей – за допомогою алгоритму ClustalW.

Філогенетичні дерева будували використовуючи програмне забезпечення MEGA 6.0 (Tamura, 2013). Еволюційні зміни встановлювали методом аналізу дискретних ознак — Maximum Likelihood (ML).

Для статистичної оцінки значущості результатів застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій 1000, за допомогою якого оцінювали достовірність позиції кожного таксону (Felsenstein, 1985). Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel 2010 із врахуванням t-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Ідентифікація ЦВС2 в Україні. Впродовж виконання дослідження з метою виявлення цирковірусу 2 типу в зразках, виділених від хворих свиней, було проаналізовано і описано морфолого-патологічний та клінічний стан 352 тварин з господарств 24 областей України та АР Крим. Матеріал для дослідження було відібрано від свиней, що загинули або були вимушено забиті. Крім того, ці тварини мали певні зовнішні та внутрішні патологічні зміни, характерні для цирковірус-асоційованих захворювань.

Нами було встановлено, що зовнішні ознаки цирковірус-асоційованих синдромів найбільше характерні для свиней середньої вікової групи (4-16 тижнів) та частково наявні у тварин молодшої та старшої вікових груп. Такий результат корелює з відомостями стосовно того, що інфікування свиней цирковірусом 2 типу відбувається переважно після зниження рівня колострального імунітету у віці близько 6-7 тижнів.

Також було підтверджено, що серед зовнішніх ознак ураження, переважає саме схуднення тварин. Загалом, усі відібрані для дослідження

тварини відставали у вазі, що притаманна певній віковій групі на 15-30 %, а у деяких випадках й на 50 %. Водночас, переважним морфолого-анатомічним порушенням, яке спостерігалось серед досліджених тварин, було ураження лімфатичних вузлів, що виявлялось у їхньому значному збільшенні з обширними крововиливами та некрозом. Також у значній кількості досліджених тварин виявляли інтерстиціальні пневмонії та ентерити.

З метою виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу у відібраних зразках було проведено підбір праймерів для ампліфікації фрагментів геному згаданого збудника на підставі повних нуклеотидних послідовностей ізолятів ЦВС2, доступних в GenBank. Також було встановлено положення цих праймерів на нуклеотидній послідовності геному референт штаму ЦВС2 та визначено рівень гомології нуклеотидних послідовностей праймерів до матричної послідовності. Так, праймери CVSTL_1F та CVSTL_3R характеризувалися 100 % та 96,2 % рівнем гомології до нуклеотидної послідовності геному ізоляту AF117753, що належить до 2D генотипної групи, відповідно (рис.1).

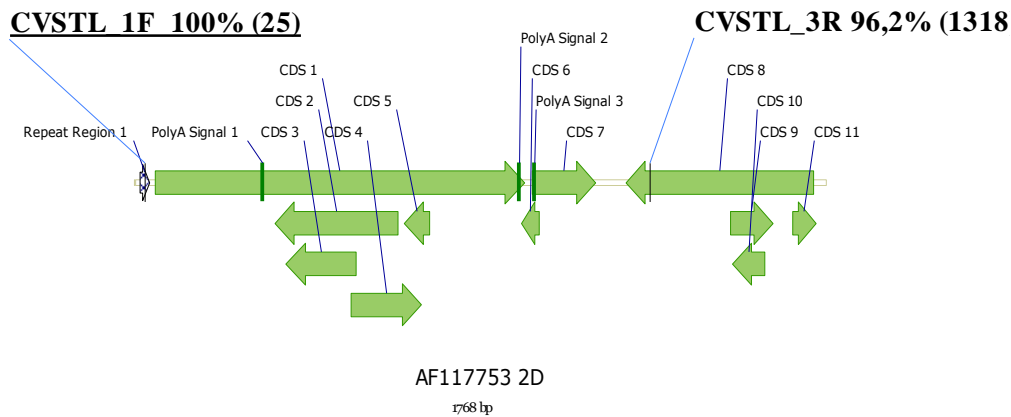


Рис. 1. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до геному ЦВС2 на підставі нуклеотидної послідовності референт-штаму, код доступу якого у базі даних GenBank – AF117753.

Як об'єкт порівняння використано праймери Cir_orf2_F та Cir_orf2_R (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика праймерів, використаних для проведення ПЛР

| № | Праймер | Орієнтація праймеру | Нуклеотидна послідовність праймеру | Положення у геномі |
|---|------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|
| 1 | CVSTL_1F | прямий | 5'-CACCTCGGCAGCACCTCA G-3' | 25-44 |
| 2 | CVSTL_3R | зворотній | 5'-CCACAGCCСТААССТАТГА СС-3' | 1297-1318 |
| 3 | Cir_orf2_F | прямий | 5'-ATGGTTACACGGATATTG TAGTCC -3' | 1086-1110 |
| 4 | Cir_orf2_R | зворотній | 5'- TCCCGCACCTTCGGATAT ACTG -3' | 1567-1588 |

Примітка: 1, 2 – праймери підібрані до нуклеотидної послідовності генів Rep- та Cap-протеїнів ЦВС2; 3, 4 – праймери, підібрані до нуклеотидної послідовності гену Cap-протеїну.

У результаті дослідження було розроблено тест-систему для проведення ПЛР на основі діагностичних пар праймерів до консервативних ділянок генів Rep- та Cap-протеїнів ЦВС2. На підставі проведеного аналізу можна стверджувати, що описані пари праймерів характеризуються дуже високими рівнями специфічності до нуклеотидних послідовностей усіх генотипних груп ЦВС2, оскільки рівень їхньої гомології переважно становив 100 %, а у деяких випадках варіював на рівні 90,5 %, 95,8 – 96,8 %.

Визначення ефективності розробленого методичного підходу для детекції цирковірусу свиней 2 типу було проведено шляхом порівняння даних, отриманих у незалежних реакціях із використанням 2-х окремих пар діагностичних праймерів. Враховуючи вищевикладене, можна підсумувати, що розроблений нами молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R дозволяє виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі різних тканин, відібраних від свиней різного віку та різних областей України без хибно-позитивних та хибно-негативних результатів і забезпечує високий рівень ефективності.

Вивчення філогенетичних особливостей та поширення цирковірусу свиней 2 типу серед свійських та диких тварин на території України. Нами було вивчено динаміку розповсюдження та характер поширення ЦВС2 в інтерфейсі тваринництва в Україні. Зважаючи на те, що починаючи з 2007 року в багатьох господарствах було зафіксовано виникнення захворювання, що характеризувалось високим рівнем смертності свиней та наявністю специфічних симптомів, притаманних цирковірус-асоційованим синдромам, дослідження було спрямовано на виявлення збудника.

На першому етапі досліджень з 2007 по 2009 роки включно відбір матеріалу було проведено від тварин з підозрою на наявність ЦВС2-асоційованого захворювання з господарств 22 областей України. Таким чином дослідили 108 зразків. Тоді як на другому етапі досліджень, а саме з 2010 по 2012 роки включно було проаналізовано ще 244 зразки вже з усіх областей України та АР Крим. Загалом досліджено 352 зразки від свиней з промислових господарств України. Вивчення динаміки поширення ЦВС2 в Україні за весь досліджений період з 2007 по 2012 рік, засвідчує, що з тривалістю дослідження зростає кількість зареєстрованих випадків.

Більшість зразків, а саме 81, було відібрано з Київської області. З них 31 зразок був позитивним щодо наявності ЦВС2, а інші 50 були негативними, отже частота розподілу вірусу в цій області становить близько 38 %. З 29 зразків отриманих з Дніпропетровської області ЦВС2 було виявлено у 15 зразках, що становить 52 %; з 26 зразків Черкаської області ЦВС2 було виявлено в 7, що становить 27 %; у зразках з Донецької області вірус виявлено у 20 з 41 дослідженого зразка, і це становить 49 % досліджуваного матеріалу. Також ЦВС2 було ідентифіковано у 7 з 14, а саме 50 % зразків з Одеської області; 4 з 8 зразків (50 %) Сумської області та 12 з 33 зразків (36 %)

Чернігівської області. Однакова поширеність ЦВС2 спостерігалася у Полтавській та Вінницькій областях, де вірус було виявлено у 12 із 28 проб, та у 6 з 14 зразків, відповідно, що становило 43 %. В той же час, у Запорізькій та Херсонській областях ЦВС2 був ідентифікований у 25 % та 42 % зразків, а саме у 2 з 8 зразків і відповідно до 5 із 12. Більш низька поширеність ЦВС2 була характерна для Львівської та Харківської областей, де лише у 2 з 6 та 2 з 8 зразків, ідентифіковано ЦВС2, що відповідало 33 % та 25 %. У Миколаївській області вірус ідентифіковано у 4 з 6 зразків, що становить 67 %, а з Тернопільщини 4 з 5 (80 %) зразків були позитивними, це доволі високі показники, хоча кількість проаналізованих зразків – менше середньої (рис.2).



Рис. 2. Поширення ЦВС2 територією України впродовж 2007-2012 років.

Наша оцінка розподілу вірусу засвідчує, що поширеність ЦВС2 на території України становить близько 41,5 %, оскільки вірус виявлено у 144 з 352 зразків. Вказаний рівень усереднений і характеризує регіони, де вивчали від 16 до 30 зразків. Такий індекс поширення ЦВС2 співвідноситься з даними, отриманими дослідниками в інших європейських країнах. В Хмельницькій, Рівненській, Житомирській, Івано-Франківській областях ЦВС2 ідентифіковано не було.

Підсумовуючи дані описаних довготермінових і великомасштабних досліджень, можна констатувати, що ЦВС2 є надзвичайно поширеним вірусом на всій території України. Вперше ідентифіковано цирковірус свиней 2 типу у 20 із 24 областей України та АР Крим. Таким чином, ЦВС2 є поширеним на всій території України. Найбільшу кількість випадків захворювання зафіксовано у Дніпропетровській, Донецькій, Київській, Полтавській, Черкаській та Чернігівській областях, в яких частота виділення у період з 2007 по 2012 рік коливалась від 26,9 до 51,7%.

ЦВС2 є найменшим ДНК-вмісним вірусом і, як очікувалось, мав би бути досить консервативним. Однак сучасні ізоляти виявляють значні генетичні варіації що, безумовно, зумовлено інтенсивним промисловим вирощуванням

свиней у всьому світі та профілактичними заходами (Franzo et al, 2016). Швидкість заміщення нуклеотидів для ЦВС2 оцінюється в порядку 1.2×10^{-3} заміни на сайт на рік, що є найбільшою зареєстрованою швидкістю заміщення для одноланцюгового ДНК-вірусу, дозволяючи ЦВС2 мати еволюційну динаміку подібну одноланцюговим РНК-вірусам (Firth et al, 2009).

При вивченні ізолятів, поширених в межах країни необхідно встановлювати не лише факт наявності вірусу, а й визначати його приналежність до тієї чи іншої генетичної групи (Chao-Ting e tal, 2015). Проведення філогенетичного аналізу дозволяє встановити еволюційні зв'язки, поширення та шляхи потрапляння ізолятів вірусу. Виокремлюють декілька генотипних груп ЦВС2, до яких відносять ізоляти, виділені як від свійських тварин так і від диких кабанів (Cságoła et al, 2005). Тому вивчення вірусу в межах країни має включати дані з обох популяцій. На цьому етапі основним завданням було оцінити біорізноманіття ЦВС2 в спорадично обраних віддалених регіонах України. Нами проведено повногеномне секвенування 4-х ізолятів вірусу, виділених з 4-х регіонів України, а саме Черкаської, Харківської, Чернігівської та Запорізької областей. Всі послідовності ЦВС2 у цьому дослідженні мали довжину генома 1768 нт та виявлені ідентичності нуклеотидів в межах 95 – 100 %, що вказує на наявність відмінностей між генотипами виділених ізолятів ЦВС2.

Філогенетичний аналіз, реконструйований з 4 послідовностей Черкаської, Харківської, Чернігівської, Запорізької областей України та послідовностей, опублікованих в базі GenBank, що представляють різні генотипи ЦВС2, наведено на рис.3. Як видно з рисунку, два українські ізоляти ЦВС2 належали до генотипу 1 (ЦВС2-1b), і два належали до генотипу 2 (ЦВС2-2a) відповідно до класифікації, запропонованої Grau-Roma (2008). На підставі підгрупової класифікації, описаної раніше (Olvera et al., 2007), було проведено порівняння та класифікацію нуклеотидів в діапазоні 262-267 та амінокислот 88-89 послідовності ORF2. Нуклеотидні послідовності "CCCCGC", "CCCCTC" та "AAAATC" є унікальними мотивами, характерними для ЦВС2 підгрупи 1A/B, 1C та ЦВС2-2a, відповідно. Амінокислота "PR" була виявлена тільки в підгрупі 1A/B, тоді як PL і KI були пов'язані з підгрупою 1C та ЦВС2-2a (Cheung et al., 2007). Проведений філогенетичний аналіз не показав жодних доказів рекомбінації, як це повідомлялося для ЦВС2, виділених у Гонконгу, Кореї та США (Ma et al., 2007; Choi et al., 2008; Hesse et al., 2008, Zhang et al., 2015). Враховуючи той факт, що поширення цирковірусу свиней 2 типу найбільше описано для популяції свійських тварин, і практично відсутні дані щодо його розповсюдження серед популяції диких кабанів, наступним етапом нашої роботи було встановлення генетичних особливостей ізолятів ЦВС2, виділених від диких тварин і порівняння їх ізолятами, що циркулюють в інших країнах. Також було досліджено рівень генетичного різноманіття ізолятів ЦВС2, поширених на рівні обох популяцій свиней в Україні.

Ця інформація може бути використана для з'ясування еволюційних зв'язків ізолятів вірусу між вказаними групами. У роботі проведено виділення ДНК та секвенування нуклеотидних послідовностей геномів ЦВС2, ізольованих від диких кабанів, з чотирьох регіонів України. А також порівняння їх з секвенсами ізолятів, виділених від свійських свиней, тих же регіонів (рис. 4).

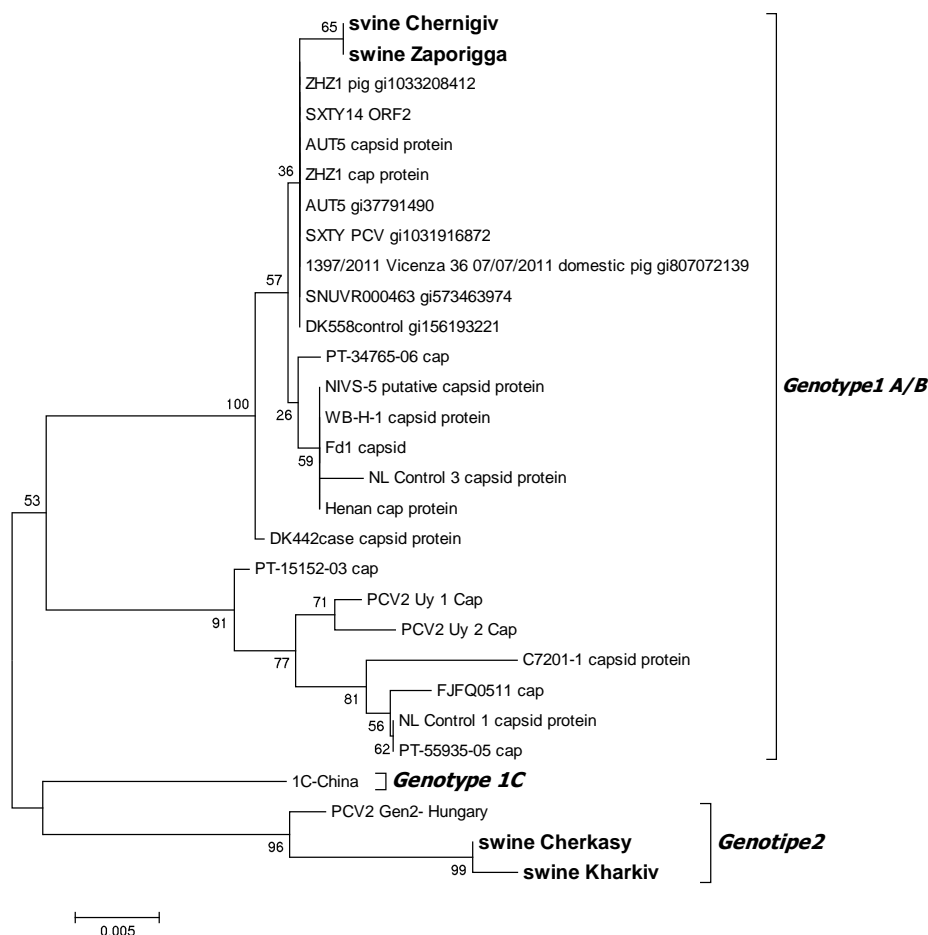


Рис. 3. Еволюційні зв'язки ЦВС2 (NJ з 1000 бутстреп реплікацій).

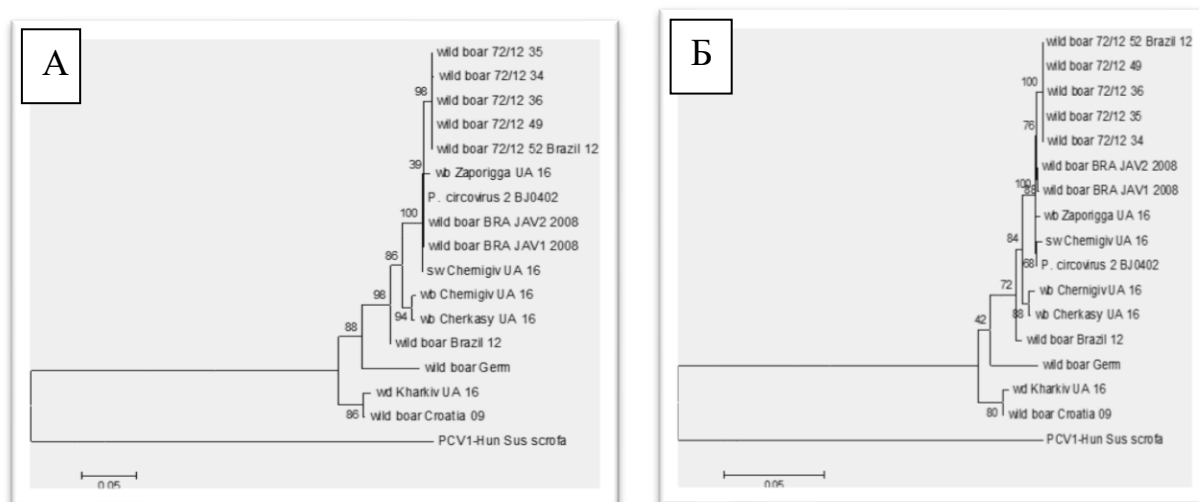


Рис. 4. Молекулярно-філогенетичний аналіз амінокислотних (А) та нуклеотидних (Б) послідовностей ЦВС2, виділених від свиней та диких кабанів.

Всі 4 послідовності українських ізолятів ЦВС2 від диких кабанів мали довжину геному 1768 нт. В той же час, рівень гомології послідовностей вказаних ізолятів від становив 91,5 – 99 %, що свідчить про істотні відмінності між генотипами ЦВС2, ізольованих від диких кабанів з різних країн світу. Топологія дерев, що базується на даних нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, співпадає і підтверджує обґрунтованість наших висновків.

Порівняння циркулюючих штамів від диких та свійських тварин в Україні засвідчило, що більшість з них є досить різними і належать до різних підгруп. Така ж ситуація була описана і в інших європейських країнах. Втім штамми, виділені від свиней Запорізької та Чернігівської областей, мають спільне походження зі штамом, виділеним від кабанів у регіоні Запоріжжя. Крім того, штамми, виділені у тварин з Черкаської та Харківської областей, мають спільне походження зі штамми, виділеними від кабанів з Харківської області (рис. 5).

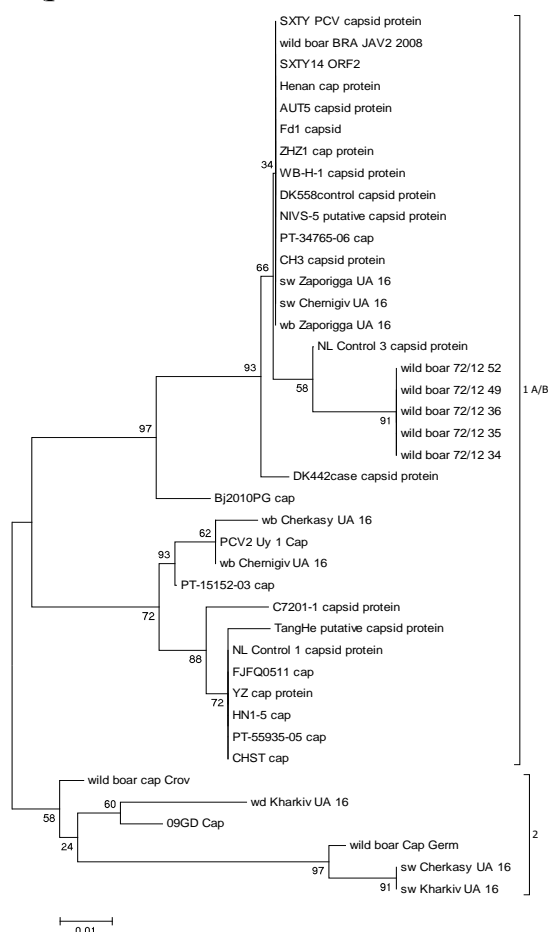


Рис. 5. Еволюційні зв'язки ізолятів ЦВС2, виділених від свиней та диких кабанів (NJ з 1000 бутстреп реплікацій).

Цей факт демонструє загальне походження описаних ізолятів і може бути спричинений прямою передачею ЦВС2 між кабанами та сільськогосподарськими тваринами, що не допускається політикою біозахисту. Аналіз філогенетичного дерева (рис. 5) дозволяє класифікувати досліджені ізоляти у дві підгрупи відповідно до класифікації, запропонованої Grau-Roma (2008). Ізоляти, виділені від диких кабанів із Запорізької,

Чернігівської та Черкаської областей знаходяться в кластері ізолятів 1А/В підгрупи разом з ізолятами ЦВС2 від кабанів з Бразилії та Німеччини. Водночас, ізоляти із Харківської області були розділені на 2 субкластери, однак належать до одного кластеру ізолятів підгрупи 2 (рис. 5). Отже, в результаті дослідження було показано, що ізоляти з Чернігівської, Запорізької, Черкаської та Харківської областей належать до різних субгруп ЦВС2 та мають різне походження. Крім того, встановлено досить високий рівень подібності з ізолятами з Хорватії та Бразилії. Водночас, показано подібність ізолятів, виділених від диких кабанів з Запорізької та Чернігівської областей з такими, що були виділені від тварин з промислових господарств. А отже, в Україні доведено факт, безпосередньої передачі цирковірусу свиней 2 типу між дикими кабанями та свійськими тваринами, що значним чином ускладнює можливості передбачення епізоотологічної ситуації та потенційних спалахів ЦВС2 в обох популяціях.

Розробка комплексного підходу до діагностики ЦВС-асоційованих синдромів. Особливою характеристикою захворювань, асоційованих з цирковірусом свиней 2 типу є те, що здебільшого розвиток синдромів відбувається за змішаної інфекції, викликаній ЦВС2 та іншими патогенами свиней як вірусної етіології, так і бактеріальної: А це, своєю чергою, значно ускладнює діагностику цирковірус-асоційованих синдромів. Також у польових та лабораторних дослідженнях із використанням гнотобіонтних тварин неодноразово було продемонстровано, що наявність лише генетичного матеріалу вірусу в тканинах тварини не є визначальним діагностичним показником. Високий рівень контагіозності та смертності свиней за згаданого захворювання зумовлює необхідність розроблення та застосування експрес-методів діагностики з метою як найшвидшої ідентифікації збудника у зразках та запровадження карантинних і профілактичних заходів. Таким методичним підходом може бути створення тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, що є найшвидшим методом виявлення ЦВС2 як за хронічного та персистентного перебігу захворювання, так і для диференційного виявлення згаданого вірусу від інших збудників захворювань свиней. Також лише за допомогою вказаного методичного підходу можливим є виявлення вірусоносійства, що необхідно для контролю за розповсюдженням інфікування. Однак це не забезпечує діагностичний аналіз наявності саме тих патолого-морфологічних змін, що викликані ЦВС2, а не іншими патогенами, а також диференціювання усіх можливих ЦВС2-асоційованих синдромів між собою. Саме тому, для найбільш точної діагностики ЦВС2-асоційованих захворювань, необхідним є комплексний підхід із застосуванням ПЛР разом із комплексним проведенням гістологічного та імуногістохімічного аналізу, що дає можливість оцінювати характер патолого-морфологічних змін тканин органів та встановлювати зв'язок між наявністю вірусу та синдромом, що розвивається.

Для виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу у відібраних зразках методом ПЛР в реальному часі було розроблено праймери

та зонди, які б характеризувались повною унікальністю та низкою переваг, порівняно з уже існуючими та описаними. Обидва розроблені олігонуклеотидні зонди володіють умовно однаковими показниками специфічності. Проте, враховуючи особливості положення вказаних зондів на нуклеотидній послідовності, для діагностичної системи було обрано зонд PCVLD_probe1, не зважаючи на те, що зворотній праймер гібридується на наступному нуклеотиді після зонду (табл. 2). Таким чином, можемо стверджувати, про абсолютну унікальність та 100 % аналітичну специфічність розроблених праймерів та зондів, які, окрім того, характеризуються високими термодинамічними та реакційними показниками.

Таблиця 2

Характеристика прямого та зворотнього праймерів і олігонуклеотидних зондів, розроблених для виявлення генетичного матеріалу цирковірусу свиней 2 типу методом ПЛР в режимі реального часу

| Назва оліго-нуклеотиду | Нуклеотидна послідовність | Розмір, н.о. | Температура гібридації, °C |
|------------------------|---------------------------------------|--------------|----------------------------|
| PCVLD_F | 5'-СТААТТТТГСА GACCCGGAAAC-3' | 22 | 60,4 |
| PCVLD_R | 5'-ТСААТААСААС САСТТСТТCACCA -3' | 24 | 60,8 |
| PCVLD_ probe1 | 5'- GAAACAAGTGGTGG GATGGTTACCA -3' | 25 | 65,4 |
| PCVLD_ probe2 | 5'- CACCTAGAAACAAG TGGTGGGATGG -3' | 25 | 65,5 |

Розроблений нами молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів PCVLD_F і PCVLD_R та ДНК-зондів PCVLD_probe1 й PCVLD_probe2 дозволяє виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі різних тканин від тварин різного віку. Вказані результати продемонстровано із використанням польових ізолятів, виділених в Україні, а також із застосуванням офіційно зареєстрованих ізолятів, наданих міжнародним центром ветеринарної лабораторної діагностики «GD», Девентер, Нідерланди.

Гістологічний аналіз патолого-морфологічних змін проводили в тканинах органів, відібраних у тварин, у зразках від яких було виявлено цирковірус свиней 2 типу методом ПЛР. У результаті аналізу було встановлено, що у переважній більшості обстежених тварин (37 з 54) спостерігаються патологічні зміни у лімфатичних вузлах, а саме виснаження фолікул лімфатичного вузла, що варіює від 10 до 100 % (рис. 6). Окрім зареєстрованих змін тканини лімфатичних вузлів, патолого-морфологічні ураження спостерігалися і у структурі іншого органу імунної системи свиней – селезінці, а також у легенях досліджених зразків від 26 з 54 свиней. Зокрема, було зареєстровано значне потовщення інтерстицій легень за рахунок лімфоцитарної інфільтрації та некротичні зміни паренхіми органу (рис. 7). Крім того, спостерігали велику кількість крововиливів у легеневій тканині, а

особливо у перибронхіальних ділянках, а також пери бронхіальну фіброплазію та капілярний виразковий бронхіт. При дослідженні структури кишковика у 13 з 54 досліджених зразків спостерігалися крововиливи у підслизовій оболонці органу, некротичні зміни епітелію слизової та підслизової оболонок і вкорочення ворсинок. Патолого-морфологічні зміни кишковика характеризувались також наявністю лімфоцитарних інфільтрацій у підслизовій оболонці, що призводило до втрати структури органу. Серед встановлених патолого-морфологічних змін печінки було виявлено значні зони некрозу гепатоцитів, потужні крововиливи та ознаки запального процесу в паренхімі органу.

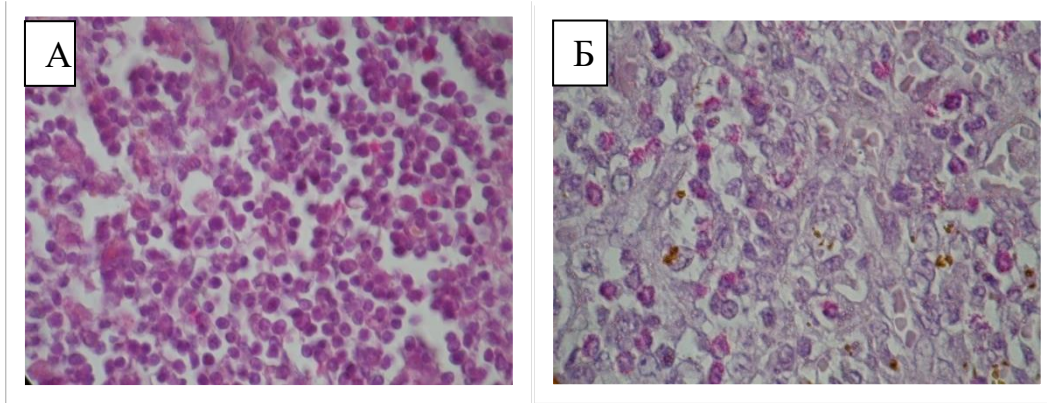


Рис. 6. Виснаження фолікулів лімфатичного вузла свиней, збільшення в 4000 разів: А – виснаження на 10 %; Б – виснаження на 100 %.

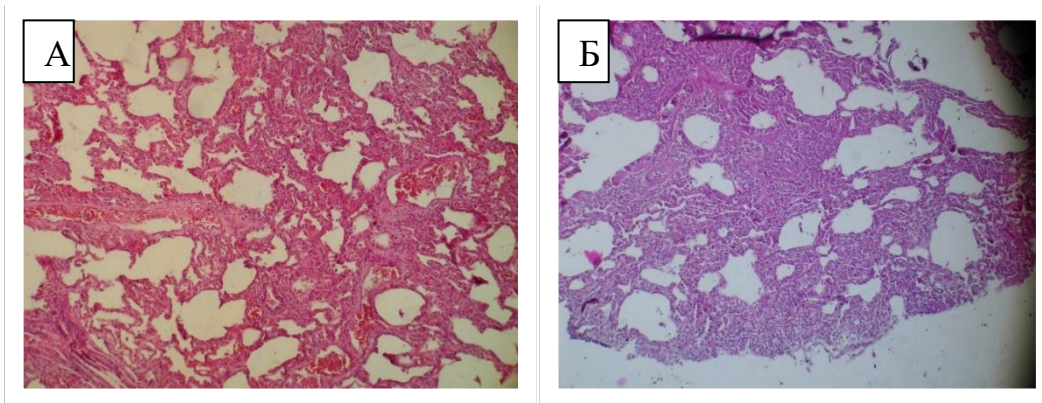


Рис. 7. Патолого-морфологічні зміни структури легень, збільшення в 400 разів: А – некротичні зміни паренхіми органу, Б – значне потовщення інтерстицій легень.

На підставі результатів аналізу патоморфологічних змін, можна зробити висновки, що найбільше відхилень спостерігається в органах імунної системи, а саме лімфовузлах та селезінці. Діагностично важливі порушення було виявлено також і в структурі легень, кишковика та печінки тварин, тоді як специфічних змін тканин мозку, трахей, серця, нирок і шлунку виявлено не було. Як бачимо, поєднання методу ПЛР в реальному часі та гістологічного аналізу дозволяє встановити чіткий зв'язок між виявленням вірусу та розвитком захворювання, яке він викликає. Однак, гістологічний аналіз не є показовим, та не може бути використаний для дослідження абортіваних

плодів та підтвердження діагнозу ЦВС2-асоційованих репродуктивних порушень, особливо за одночасного інфікування вірусом РРСС, що викликає аналогічні морфолого-патологічні зміни. Тому нами було продемонстровано можливості імуногістохімічного підходу з метою безпосереднього виявлення антигену ЦВС2 в тканинах абортованих плодів (рис. 8.)

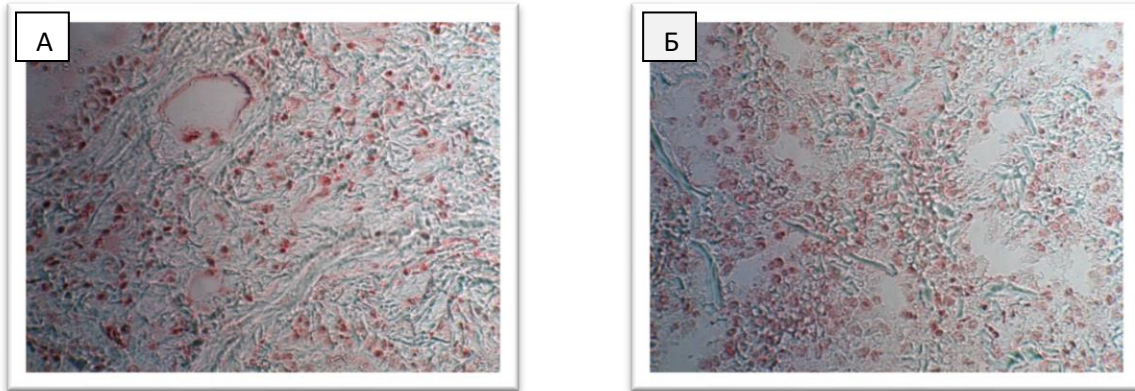


Рис. 8. Тканина міокарду (А), тканина легень (Б); абортований плід інфікований ВРРСС та ЦВС2. Внутрішньоцитоплазматичне зафарбування антигену ЦВС2 в міокарді (А) та легнях (Б). Імуногістохімічне пофарбування x400.

Використання імуногістохімічного методу для діагностики ЦВС2 є актуальним та показовим, оскільки ми не отримали хибнонегативних результатів навіть у випадку незначного вірусного навантаження під час аналізу 1156 абортованих плодів, з 65 господарств 24 областей України та АР Крим в період з 2007 по 2013 роки.

ВИСНОВКИ

В дисертації була вирішена науково-практична проблема – досліджені молекулярно-біологічні та філогенетичні особливості та поширення ізолятів ЦВС2 в Україні. Розроблено комплексний підхід до діагностики цирковірус-асоційованих синдромів у патологічному матеріалі шляхом молекулярно-біологічного, гістологічного та імуногістохімічного аналізів, що дозволить швидко діагностувати збудник, оцінювати епізоотичну ситуацію для впровадження адекватної схеми вакцинопрофілактики, оцінювати ефективність застосованих профілактичних засобів та заходів біобезпеки для попередження розповсюдження ЦВС2 територією України.

1. Вперше ідентифіковано ЦВС2 у 20 із 24 областей України та АР Крим. Проведена оцінка розповсюдження вірусу, дозволяє стверджувати, що рівень поширення ЦВС2 в Україні сягає 41 %.
2. ЦВС-2 є поширеним вірусом в Україні, найбільшу кількість випадків захворювання зафіксовано у Дніпропетровській, Донецькій, Київській, Полтавській, Черкаській та Чернігівській областях, в яких частота виявлення коливалась від 26,9 до 51,7%. В Житомирській, Івано-Франківській, Хмельницькій та Рівненській областях – ЦВС2 ідентифіковано не було.
3. Філогенетичний аналіз українських ізолятів ЦВС2 від свійських тварин засвідчив належність вірусів до групи 1 (ЦВС2-1a\b), і до групи 2 (ЦВС2-2b).

4. Встановлені еволюційні зв'язки між ізолятами, виділеними від свійських свиней та диких кабанів з однакових регіонів України вказують на те, що більшість з них має різне походження і належать до різних підгруп. Однак ізоляти з Харківської області є високогомологічними, що може бути спричинено безпосередньою передачею ЦВС2 між кабанами та сільськогосподарськими тваринами.
5. Розроблений нами універсальний молекулярно-біологічний підхід із використанням праймерів CVSTL_1F та CVSTL_3R дозволяє ефективно виявляти цирковірус свиней 2 типу методом ПЛР у матеріалі різних тканин. Він є високоспецифічним, оскільки забезпечує диференційне виявлення саме цього вірусу, навіть від таких близькоспоріднених вірусів як ЦВС1 та BFDV.
6. Для діагностики ЦВС2 найбільш доцільно відбирати зразки лімфатичних вузлів та кишковика, або ж проводити діагностування об'єднаних зразків вказаних органів.
7. Експрес-метод виявлення генетичного матеріалу ЦВС2 на основі кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням праймерів PCVLD_F і PCVLD_R та ДНК-зондів PCVLD_probe1 й PCVLD_probe2 дозволяє виявляти цирковірус свиней 2 типу у матеріалі різних тканин від тварин різного віку без хибно-позитивних та хибно-негативних результатів і забезпечує високий рівень ефективності.
8. Для комплексної діагностики всіх ЦВС2-асоційованих синдромів рекомендуємо підхід, що поєднує результати, отримані на основі ПЛР в реальному часі з даними гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

Список

наукових праць, опублікованих за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Гістологічні аспекти цирковірус-асоційованого синдрому свиней, уражених цирковірусом 2-го типу // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – №73. – С. 77-79. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
2. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Молекулярно-біологічні та епізоотологічні особливості цирковірусу 2 типу як збудника емерджентного захворювання свиней в промислових господарствах України // Наукові записки НАУКМА–2014. – №67. – С. 23-28. *(Здобувачем проаналізовані літературні джерела).*
3. Dudar L.V., Polischuk V.P., Budzanivska I.G., Balka G., Csagola A. Complete genome sequence of porcine circovirus type 2 Ukrainian isolates // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. – 2016. – №72. – С. 5-8. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

які входять до міжнародних наукометричних баз даних

4. Dudar L.V., Budzanivska I.G., Polishchuk V.P. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars detected in different regions of

Ukraine // Biopolym. Cell. – 2018. – №34. – С. 41-48. (Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).

5. Dudar L.V., Polishchuk V.P., Sobko I.A., Budzanivska I.G. The nature of the spread of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine during the period from 2007 to 2012 // ScienceRise. Biological Science.– 2018. – №10. – С. 39-44.(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).

6. Ivashchenko O.A., Dudar L.V., Polischuk V.P. Detection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus using PCR and immunohistochemistry in the tissues of abortion fetuses // Науковий вісник НУБіП.– 2016. – №58. – С. 14. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).

Тези наукових доповідей:

1. Dudar L.V., Ivashchenko O.A. Prevalance of PRRSV and PCV2 associated abortions in Ukraine in 2007-2012 period // Vth European symposium of porcine health management; Edinburg, UK:abstr. – 2013. – p.132.

2. Дудар Л.В., Поліщук В.П. Характер поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в період з 2007 по 2012 роки // VII Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси»: зб. тез. – Київ, 2013. – С. 53.

3. Dudar L.V., Polishchuk V.P., Sobko I.A. The features of porcine circovirus type 2 as an emerging in Ukraine // The 23d International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Cancun, Mexico:abstr. – 2014, p. 549.

4. Dudar L.V., Polischuk V.P. Distribution of porcine circovirus type 2 among pigs with respiratory pathology in different geographical regions of Ukraine during 2014-2015 // The 24th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Dublin, Ireland:abstr. – 2016, p.1125.

5. Dudar L.V. Qualitative diagnosis and effective prevention of viral infection - Key factors for animal health // VIII Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси». – Kyiv, 2016.

АНОТАЦІЯ

Дудар Л.В. Молекулярно-біологічна характеристика ізолятів цирковірусу свиней 2 типу, ідентифікованих в Україні. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена ідентифікації цирковірусу свиней 2 типу в Україні, вивченню динаміки його розповсюдження та встановленню філогенетичних особливостей і еволюційних зв'язків між українськими ізолятами, виявленими у свиней з промислових господарств та серед диких тварин. Крім того, було розроблено метод комплексної діагностики для диференціації всіх ЦВС2-асоційованих захворювань свиней.

Вперше ідентифіковано цирковірус свиней 2 типу у 20 із 24 областей України та АР Крим. Проведена оцінка розповсюдження вірусу, дозволяє стверджувати, що рівень поширення ЦВС2 в Україні сягає 41%. З метою виявлення всіх потенційно можливих генотипів ЦВС2 була розроблена та апробована тест-система на основі ПЛР.

Філогенетичний аналіз українських ізолятів ЦВС2 показав належність вірусів до групи 1 (ЦВС2-1a\b), і до групи 2 (ЦВС2- 2b).

Встановлені еволюційні зв'язки між ізолятами, виділеними від свійських свиней та диких кабанів з однакових регіонів України вказують на те, що більшість з них має різне походження і належать до різних підгруп. Однак ізоляти з Харківської області є високогомологічними, що може бути спричинено прямою передачею ЦВС2 між дикими та свійськими тваринами.

Розроблено підхід для комплексної діагностики всіх ЦВС-асоційованих синдромів, що поєднує результати, отримані на основі ПЛР в реальному часі з даними гістологічного та імуногістохімічного аналізу.

Ключові слова: цирковірус свиней 2 типу (ЦВС2), ідентифікація ЦВС2, поширення ЦВС2 в Україні, філогенетичний аналіз українських ізолятів ЦВС2, діагностика ЦВС2.

АННОТАЦИЯ

Дудар Л. В. Молекулярно-биологическая характеристика изолятов цирковируса свиней 2 типа, идентифицированных в Украине. – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2019.

Диссертация посвящена идентификации изолятов цирковируса свиней 2 типа в Украине, изучению динамики его распространения, а также выяснению филогенетических особенностей и их эволюционных связей. Кроме того, был разработан метод комплексной диагностики для дифференциации всех ЦВС2-ассоциированных заболеваний свиней.

Впервые идентифицирован цирковірус свиней 2 типа в 20 из 24 областей Украины и АР Крым. Проведенная оценка распространения вируса, позволяет утверждать, что уровень распространения ЦВС2 в Украине достигает 41%. С целью выявления всех ожидаемых генотипов ЦВС2 была разработана и испытана новая тест-система на основе ПЦР.

Филогенетический анализ украинских изолятов ЦВС2 показал принадлежность вирусов к группе 1 (ЦВС2-1a\b), и к группе 2 (ЦВС2-2b).

Установлены эволюционные связи между исолятами, выделенными от домашних свиней и диких кабанов из одних и тех же регионов Украины указывают на то, что большинство из них имеет различное происхождение и принадлежат к разным подгруппам. Однако исоляты из Харьковской области являются высокомологічними, что может быть вызвано прямой передачей ЦВС2 между кабанамі и селськогосподарськими животними.

Разработан подход к комплексной диагностике всех заболеваний, связанных с ЦВС2, который сочетает результаты, полученные с помощью

ПЦР в реальном времени, с данными гистологического и иммуногистохимического анализа.

Ключевые слова: цирковироз свиней 2 типа (ЦВС2), идентификация ЦВС2, распространение ЦВС2 в Украине, филогенетический анализ украинских изолятов ЦВС2, диагностика ЦВС2.

SUMMARY

Dudar L.V. Molecular and biological characteristics of porcine circovirus type 2 isolates identified in Ukraine. – Manuscript.

The thesis for a candidate's degree in biological sciences (Doctor of Philosophy) by specialty 03.00.06 "Virology". – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the study, identification of porcine circovirus type 2 isolates in Ukraine, the dynamics of its spreading, as well as to the clarification of phylogenetic features and evolution connections between Ukrainian isolates, detected from swine in production herds and wild animals. Moreover, total diagnostics approach has been developed for differentiation of all PCV2-associated diseases of swine.

For the first time, Porcine Circovirus type 2 was identified in 20 of 24 regions of Ukraine and Crimea. The assessment of the spread of the virus has been carried out, which allows us to assert that the level of distribution of PCV2 in Ukraine reaches 41%. With the aim of detection of all expected genotypes of PCV2 strains, the new PCR-based test-system was developed and approved.

Phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of PCV2 showed the belonging of viruses to group 1 (PCV2-1a\|b) and group 2 (PCV2-2b).

The established evolutionary relationships between isolates, detected from pigs in swine herds and wild boars from the same regions of Ukraine indicate that most of them have different origins and belong to different subgroups. However, isolates from the Kharkiv oblast' are highly homologous, which may be due to the direct transfer of PCV2 between wild boars and farm animals.

An approach for the comprehensive diagnosis of all PCV2-associated diseases, which combines the results obtained by Real Time PCR with the data of histological and immunohistochemical analysis, is developed. For the reason of quick and routine laboratory detection of PCV2 in different tissues and pathological materials, effective and potential RT-PCR approach was developed and confirmed by trials. At the same time, huge histological investigations were used for differentiation of most PCV2-associated diseases, specific morphological and pathological changes were described that should be used for diagnosis confirmation. Moreover, this comprehensive approach has been added by immunohistochemistry tool for antigen presence visualization in cases when histological changes are absent. The developed approach covers all PCV2-associated diseases and can be implemented and used in diagnostics laboratory.

Key words: porcine circovirus type 2 (PCV2), identification of PCV2, distribution of PCV2 in Ukraine, phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of PCV2, diagnosis of PCV2.

Підписано до друку 15.03.2019 р. Формат 60 x 84/16.
Папір офсетний. Друк цифровий.
Обсяг 0,9 ум.-друк. арк. Наклад 100 прим. Зам. № П-2019-534

Надруковано у ЦОП «Глобус» ФОП Кравченко Я.О.
Свідоцтво № ДК 6078 від 12.03.2018 р.
02100, м. Київ, вул. Будівельників, буд. 32/2
Тел. (044) 561-95-31, (067) 506-57-55, (050) 57-06-555.